

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/50

G01N 33/58 G01N 33/68

G01N 33/74 G01N 21/64

C12Q 1/68



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03137051.9

[43] 公开日 2004 年 12 月 8 日

[11] 公开号 CN 1553186A

[22] 申请日 2003.6.2 [21] 申请号 03137051.9

[71] 申请人 中国医学科学院药物研究所

地址 100050 北京市宣武区先农坛街 1 号

共同申请人 东南大学

[72] 发明人 杜冠华 陆祖宏 周 勇 殷 红  
唐祖明

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 一种兴奋剂快速检测生物芯片及其检测方法

## [57] 摘要

本发明提出了一种新的对兴奋剂进行快速筛查的方法与技术,及其相关的试剂和检测芯片。该检测方法应用兴奋剂受体蛋白对于兴奋剂分子的特异性结合特性,把兴奋剂的相关受体固定于固相载体表面,通过兴奋剂分子和标记的兴奋剂分子在其受体上的竞争作用,来检测样品中的兴奋剂成分,从而实现被检测对象的快速初筛。

ISSN 1008-4274

1. 一种兴奋剂快速检测生物芯片, 其特征在于: 在固体载体表面固定有被检测兴奋剂分子的受体蛋白质。
- 5 2. 根据权利要求1所述的生物芯片, 其特征在于: 所述的受体包括麻醉剂受体, 利尿剂受体, 镇静剂受体, 合成类固醇受体, 肽激素受体, 和类固醇受体。
3. 根据权利要求2所述的生物芯片, 其特征在于: 所述的受体还包括促红细胞生长素受体。
4. 根据权利要求1或2所述的生物芯片, 其特征在于: 在同一芯片板上具有有一系列微反应位点, 而这些微反应位点通过微沟槽通道连结成一封闭的具有微流体流入和流出端口的分析板或普通板芯片。
- 10 5. 一种兴奋剂快速检测方法, 包括: 1) 在被检测的兴奋剂分子上标记上某种可检测化学基团或其它的标记物; 2) 将兴奋剂检测芯片与被测试样进行相互作用, 使样品中的兴奋剂分子与对应的受体蛋白分子结合; 3) 将结合有标记物的兴奋剂与上述2) 中与样品中作用后的兴奋剂受体芯片相作用, 标记后的兴奋剂将结合到没有与样品中的兴奋剂结合的受体上; 4) 通过检测芯片上受体点阵上的标记物的强度, 可以获得样品中的兴奋剂的量。
- 15 6. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于: 可检测化学基团包括荧光基团、电化学活性基团。
- 20 7. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于: 所述的标记物包括同位素、磁性、生物素、纳米颗粒、荧光指示剂。
8. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于: 所述的受体蛋白质可以按照不同的种类制备成微阵列芯片, 芯片可同时对样品中的多种兴奋剂进行检测。
9. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于: 用荧光标记的方法来检测。
- 25 10. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于: 用电化学标记的方法来检测。
11. 根据权利要求4所述的检测方法, 其特征在于: 用生物素标记法, 再用带有标记物的亲和素来检测。

## 一种兴奋剂快速检测生物芯片及其检测方法

## 技术领域

5 本发明涉及一种兴奋剂快速检测生物芯片及其检测方法。

## 背景技术

生物芯片主要是指通过微细加工技术及超分子自组装技术，在固体芯片表面构建的微分析单元和系统。生物芯片可把许多不同功能器件集成在一起，例如，  
10 生物样品的预处理，遗传物质的提取，特定基因片段的扩增，生物探针阵列以及毛细管电泳形成整体的微流体系统，以实现化合物、蛋白质、核酸、细胞以及其它生物组分的准确、快速、大信息量的筛选或检测。微阵列芯片是最重要的一类生物芯片，它集成了大量的密集排列的生物分子探针，能够在短时间内分析大量的分子信息。生物芯片在生物检测、医学检验和疾病诊断、药物筛选和生物体内  
15 微量成分分析方面有着十分重要的价值。

兴奋剂检测在竞技运动中显得越来越重要，但现在兴奋剂的检测都是采用现代化学分析方法，例如，色谱、质谱、电泳等技术，即对兴奋剂分子进行一个的分离检测。因此，检测一个样品往往要花费大量的时间和经费，大大地限制了对运动员的监测范围。目前，国内外十分关注用生物芯片的方法来检测兴奋剂，特别  
20 是在对竞技人员进行现场初筛检测方面。英国等国家的科研人员声称正在研究用抗体微阵列来进行兴奋剂的检测。国内的一些单位也在制备用于微阵列的抗体芯片。应用抗体芯片来检测兴奋剂能够高通量的快速检测兴奋剂，但由于兴奋剂分子量小，制备特异性的抗体成功率低、成本较高，目前在这方面的研究进展不大。另一种兴奋剂检测芯片设计方案是采用微流体芯片的形式，即把化学分析方法，如样品分离、色谱、质谱、电泳等用微流体器件来实现，并集成在芯片中成为芯片实验室。但这种芯片技术目前尚未成熟，技术上有很大的风险，而且制备  
25 成本高，分析精度低，在实际应用中将会遇到很大的困难。随着竞技体育的迅速发展，人们对于兴奋剂检测，特别是应用于大范围现场普查的兴奋剂检测方法的需求越来越大。人们迫切需要一种能够对大量不同种类兴奋剂进行简单、快速、  
30 低成本检测的试剂和方法。

本发明所述的兴奋剂是国际体育界违禁药物的总称。国际体育组织对兴奋剂的含义作了下述规定：“健康人以特殊的目的，把药物以任何形式摄入体内，或者以不正常的方法应用了非正常量的生理物质，这些在比赛中用来提高运动成绩的作法，称之为应用兴奋剂。”国际奥委会医学会规定的兴奋剂包括精神刺激药物、  
35 交感神经胺剂、中枢神经兴奋剂、麻醉性止痛药、雄性激素及其衍生物、蛋白同

化激素等药物，酒精也属兴奋剂。

兴奋剂常可分为六大类：

第一类为刺激剂，常用的有安非他明，其次还有咖啡因、可卡因、麻黄素等，计有 40 余种之多，此类药物能通过对神经系统的作用，增强人的精神与体力，其严惩的副作用则是掩盖疲劳导致过度的兴奋与焦虑，影响运动员的判断能力常易造成受伤，并导致心率及血压的急速上升，此外还可能造成脱水，诱发脑溢血和心脏疾病。

第二类是麻醉镇痛剂，包括吗啡、其衍生物及同类合成制剂。使用后能使人产生快感及心理亢奋，给运动员造成能超越体能的幻觉，并降低痛感使运动员感觉不到受伤的真实情况，仍继续参加比赛从而造成更为严重的伤害。常用则会成瘾，故还易引起严重的生理及社会问题。

第三类称  $\beta$  阻滞剂，目前有 9 种，如心得安、心得宁、心得平等。这类药物具有镇静的作用，使用范围主要在技能类难和准确性顶群中，目的是为了减少心脏的过度兴奋，降低焦虑稳定情绪。

第四类是利尿剂，顾名思义，此类药物有稀释尿液的功能。利尿剂现有 15 种，主要用于掩盖或“清洗”体内其它违禁药品的存在，以逃避兴奋剂检查。

第五类则是合成类固醇，亦叫同化激素。最常用的有：大力补、康力龙、苯丙酸诺龙、癸酸诺龙等。这些药物作为兴奋剂作用可以说是频率最高范围最广的一类。据国外报道称：“用过的及想用的几乎占了参赛者的 80—90%。此类药物通过口服或注射，可增强运动员的肌肉，然而它们会干扰运动员体内自然激素的平衡，产生一些严重的副作用。在男性中，这些副作用包括性格改变，肾功能异常乳房增大及早秃；在女性中则会引起肌肉增生，月经失调，体毛过度生长。

第六类系源于人体自身的血液，称为血液兴奋剂或称自血回输。即从运动员本人体内抽出一定数量的血液，经处理后储备待用，赛前 1—7 天再将血细胞随生理盐水输回原抽血者体内，目的是增加循环系统中的红细胞数，籍此提高血液的携氧能力。研究表明，运动员经自血回输后，最大吸氧量和持续运动到极限的时间均有增加。

本领域技术人员公知体育比赛内禁用物质的名单。它一般包括刺激剂，麻醉剂，蛋白同化剂，利尿剂和掩盖剂（离子转运体配基），肽类激素、模拟剂及类似物，大麻素， $\beta$ -阻断剂，皮质类固醇，局部麻醉剂等等。

现有技术中，这些物质的测定一般都是按照传统的经过规定测定方法，检测时间较长。

发明内容：

为了克服现有技术的不足之处，本发明的目的在于提出一种基于兴奋剂受体微阵列芯片。

本发明的另一目的在于提供一种及其检测利用这种芯片进行检测的方法。

该兴奋剂检测芯片可同时对于多项兴奋剂指标进行快速分析，且试样和试剂消耗量小，成本降低，操作简易可行。

因此，本发明提出了一种兴奋剂快速检测生物芯片，其特征在于：在固体载体表面固定有被检测兴奋剂分子的受体蛋白质。所述的受体包括麻醉剂受体，利尿剂受体，镇静剂受体，合成类固醇受体，肽激素受体，和类固醇受体。所述的受体还包括促红细胞生长素受体。

在本发明的生物芯片上，在同一芯片板上具有有一系列微反应位点，而这些微反应位点通过微沟槽通道连结成一封闭的具有微流体流入和流出端口的分析板（芯片）或普通板（平面板）芯片。

本发明还提供一种兴奋剂快速检测方法，包括：1）在被检测的兴奋剂分子上标记上某种可检测化学基团或其它的标记物；2）将兴奋剂检测芯片与被测试样进行相互作用，使样品中的兴奋剂分子与对应的受体蛋白分子结合；3）将结合有标记物的兴奋剂与上述2）中与样品中作用后的兴奋剂受体芯片相作用，标记后的兴奋剂将结合到没有与样品中的兴奋剂结合的受体上；4）通过检测芯片上受体点阵上的标记物的强度，可以获得样品中的兴奋剂的量。可检测化学基团包括荧光基团、电化学活性基团。所述的标记物包括同位素、磁性、生物素、纳米颗粒以及荧光指示剂。

所述的受体蛋白质可以按照不同的种类制备成微阵列芯片，芯片可同时对样品中的多种兴奋剂进行检测。本发明的检测也可以用荧光标记的方法来检测。还可以用电化学标记的方法来检测。另外，也可以用生物素标记法，再用带有标记物的亲和素来检测。

换言之，在本发明的事实方案中，直接应用兴奋剂的受体来检测兴奋剂。首先，通过生物分离纯化的方法或基因工程技术，获得的兴奋剂的作用靶点，即兴奋剂分子的受体蛋白质（例如雄激素受体、雌激素受体、各种利尿剂、或/和促红细胞生长素受体等），通过把它们固定在一固体载体表面，形成微阵列。这些被固定的受体蛋白质，能够特异性地结合所要检测的兴奋剂分子，通过检测和确定样品中兴奋剂分子与其受体的结合的兴奋剂的量，可以实现兴奋剂的检测和筛查。

上述兴奋剂快速检测芯片的检测方法的特征是采用竞争检测方法。首先制备一种标记有可检测化学基团（如荧光基团、电化学活性基团等）或其它的标记物（同位素、磁性、生物素、纳米颗粒等）的兴奋剂分子；然后，将采集并通过前处理的被测样品与上述兴奋剂检测芯片进行相互作用，使样品中的兴奋剂分子与对应的受体蛋白分子结合；再将结合有标记物的兴奋剂与的兴奋剂受体芯片相作用，由于这时芯片上受体的兴奋剂结合位点一部分已被样品中的兴奋剂小分子占据，标记后的兴奋剂只能结合在没有与样品中的兴奋剂结合的受体上；这时样品中兴奋剂分子水平较高时，其受体结合样品中兴奋剂分子的量较大，而结合被修

饰兴奋剂分子的量较少，也就是在芯片上该受体蛋白位点上获得的标记物的信号较小，即药理学中成熟的受体配基竞争结合理论和方法。因此，最后可以通过检测和确定受体微阵列芯片上的标记物的强度，获得样品中的兴奋剂的量。

该芯片可以针对不同的兴奋剂制备把多种不同的受体蛋白质固定在芯片的相应的位置，如雄激素受体、雌激素受体、各种利尿剂受体、促红细胞生长素受体等，制备成微阵列芯片，可同时对样品中的多种兴奋剂进行检测。

该微阵列芯片的其检测方法可以用荧光标记的方法来检测。通过荧光发色基团(如 Cy3, Cy5, 荧光素以及其他具有荧光的指示剂(化合物)等基团来标记兴奋剂。通过荧光显微镜、荧光扫描仪等检测其荧光信号。

该微阵列芯片的其检测方法也可以用电化学标记的方法来检测。通过电化学活性基团(如二茂铁、钌等基团来标记兴奋剂。通过受体蛋白固定于电极表面，通过循环伏安法、电位扫描法等检测受体蛋白上结合的电化学活性基团的量。

该微阵列芯片的其检测方法也可以通过间接标记法来实现。例如用生物素来标记兴奋剂分子，再用带有标记物的亲和素来检测受体分子上已被标记有生物素的兴奋剂的量。生物素标记法具有放大倍数大，灵敏度高的特点，具有一定的优势。

本发明的兴奋剂检测芯片受体一般来说可以经公知的渠道购得，或者采用现有技术的方法获得，例如

受体	来源	兴奋剂
雄激素受体	Panvera Co	雄性激素类
雌激素受体	Sigma Co	雌性激素类
肾上腺素受体	Sigma Co	激动剂和拮抗剂类
阿片受体	PerkinElmer Co	激动剂类
EPO 克隆性受体	PerkinElmer Co	激动剂类
离子转运体	重组方法获得	利尿剂类
其他受体	重组方法获得	HCG, hGH, ACTH, LH 等

具体实施方式

下面将以实施实例进一步说明本发明提出的兴奋剂检测芯片及其检测方法。

实施例 1 与肾上腺素 β 受体相关的兴奋剂的检测

与肾上腺素 β 受体相关的激动剂(兴奋剂)主要包括被用于刺激剂的部分 β 受体激动剂，如班布特诺(bambuterol)、克伦特罗(clenbuterol)、非诺特罗(fenoterol)、沙丁胺醇(salbutamol)、茶丙喘宁(reproterol)、特普他林(terbutaline)扎莫特罗(xamoterol)等，此类药物作为刺激剂能通过对神经

系统的作用，增强人的精神与体力，其严重的副作用则是掩盖疲劳导致过度的兴奋与焦虑，影响运动员的判断能力常易造成受伤，并导致心率及血压的急速上升，此外还可能造成脱水，诱发脑溢血和心脏疾病。

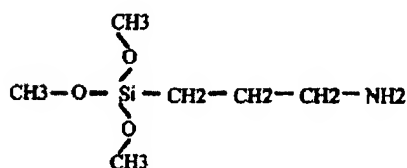
另一类为肾上腺素  $\beta$  受体阻断剂，主要包括醋丁酰心安 (acebutolol)、心得舒 (alprenolol)、心得安 (propranolol)、心得平 (oxprenolol)、阿替洛尔 (atenolol)、比索洛尔 (bisoprolol)、拉贝洛尔 (labetolol)、美托洛尔 (metoprolol) 等，这类药物具有镇静的作用，使用范围主要在技能类难和准确性顶群中，目的是为了减少心脏的过度兴奋，降低焦虑稳定情绪。本试验将人类重组 adrenergic receptor  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  制成芯片，通过样品与荧光配基的竞争结合试验检测样品中兴奋剂种类及含量，最低检出限为 3.8pg/ml。实验步骤如下：

#### 1. 载体玻片的活化：

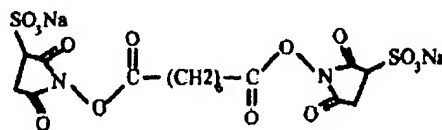
醛基化表面 (ATPS-BS<sup>3</sup>):

a : ATPS(aminopropyltrimethoxysilane)

b : BS<sup>3</sup>(bis-sulfosuccinimidyl suberate)



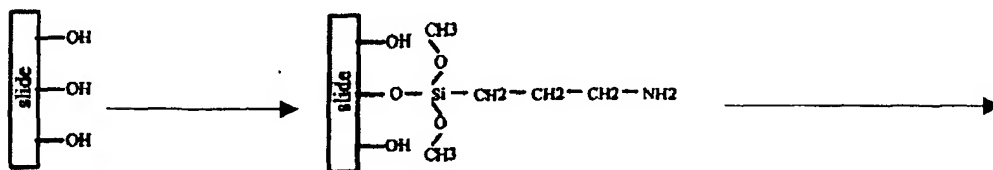
(a)

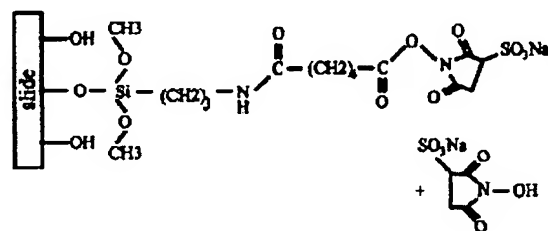


(b)

先将玻片放入 1:10 稀释了的去污剂的温水中，以超声处理 5min，然后用蒸馏水多次冲洗，再以 100% 的 HPLC 级甲醇冲洗。洗净的玻片放于烘箱内以烘干。将玻片浸入第一层包被液—ATPS 中处理 10min，再以 95% 乙醇洗涤，放于空气中干燥，然后于真空烘箱内 80°C 加热 2h。氨基化后的玻片浸入第二种包被液—BS<sup>3</sup> 中室温下浸泡 20min，然后在无尘烘箱内以 37°C 干燥 15min。完成。这样制好的 NHS-活化玻片与蛋白连接后，以蒸馏水冲洗 6h，蛋白连接保持良好。可在干燥条件下保存 6 周。

反应式：





2. 蛋白质芯片的制备：通过高精度机械分配手上所带的开缝钢针样品分配头，将人类重组 adrenergic receptor  $\beta_{1,2,3}$  受体膜蛋白（购自 sigma 公司）以原浓度点样至醛基化玻片表面上，点样用的机械手精度为  $10\mu\text{m}$ ，点的直径为 150–200 $\mu\text{m}$ ，点样量为 10–100nl / 点。膜脂质双分子层头部的氨基与玻片表面的醛基通过 Schiff 碱偶联。点样过程的温度为室温 (25 $^{\circ}\text{C}$ )，湿度为 30%–40%。点样完成后，将玻片放入充有氮气的干燥器中 4 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜，以含 0.05% Tween20 的 Tris 清洗液 (50mM TRIS-HCl, pH7.4, 10% glycerol) 缓慢清洗三次，每次 5min。用 1% BSA (50mM TRIS-HCl, pH7.4, 10% glycerol, 0.05% Tween-20 (体积比)) 作为封闭液。将玻片放入封闭液室温反应 30min，缓慢搅动用以封闭未反应的醛基，并可减低玻片表面对蛋白质的非特异性吸附。用 PBST 溶液清洗 3 次，每次 2min。即可用于竞争结合试验。

3. 样品的检测：以表面膜将玻片分隔成不同检测区，将待测样品 20–100 $\mu\text{l}$  滴于蛋白点样区，加入 2 倍体积测试液 (50mM TRIS-HCl, pH7.4, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1% BSA)，内含荧光标记配基 TMR-CGP12177 2nM (购自 Molecule Probes company)，室温静置 60min；对照区加入相同体积正常血清液和测试剂。同条件处理。反应结束后，以 Tris 清洗缓冲液冲洗 3 次，每次 2min。以激光共聚焦扫描仪于  $\text{ex}=545\text{nm}$ ,  $\text{em}=570\text{nm}$  波长测各点荧光强度。实验结果作 t 检验，有显著性变化可判断样品中含有此类兴奋剂或相同兴奋作用的药物，反之则无。最低检出限为 3.8pg/ml。如果检测阳性，则按以下公式计算  $K_i$  值，判断是何种兴奋剂。

$$K_i = \text{RFU}(\text{TMR-CGP}) / \text{RFU}(\text{specific}) \\ = \text{RFU}(\text{TMR-CGP}) / [\text{RFU}(\text{Total}) - \text{RFU}(\text{nonspecific})]$$

实验测定  $\beta$  受体激动剂扎莫特罗 (xamoterol) 对于  $\beta_1$  受体  $k_i=80\text{nM}$ ， $\beta_2$  受体  $k_i=870\text{nM}$ 。可将样品稀释或冻干浓缩测定  $K_i$  值，以确定所含药物，并可根据以上参数做标准曲线，根据荧光强度 RFU，计算出所含兴奋剂的量。

(所列部分数据见以下参考文献)

[1] MacBeath, G. and Schreiber, S.L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. Science 289, 1760–1763.

[2] Ye Fang, Anthony G. Frutos, and Joydeep Lahiri (2002) G-Protein-Coupled Receptor Microarrays. ChemBioChem 3, 987–991.)

实施例 2 与雄激素受体相关的类固醇兴奋剂的检测。



合成类固醇，亦叫同化激素。最常用的有：大力补（metandienone）、康力龙（oxymetholone）、美雄酮（mesterolone）、睾酮（testosterone）等。这些药物作为兴奋剂作用可以说是频率最高范围最广的一类。此类药物通过口服或注射，与体内雄激素受体结合，产生雄激素样作用，可增强运动员的肌肉，然而它们会干扰运动员体内自然激素的平衡，产生一些严重的副作用。在男性中，这些副作用包括性格改变，肾功能异常乳房增大及早秃；在女性中则会引起肌肉增生，月经失调，体毛过度生长。本试验将于人类受体高度同源性的鼠重组雄激素受体活性结构域蛋白 androgen Receptor (购自 panvera company, USA) 制成芯片，通过样品与荧光配基 Fluorome™ AL (购自 panvera company, USA) 的竞争结合试验检测样品中兴奋剂种类及含量，最低检出限为 6pg/ml。实验步骤如下：

1. 制备蛋白质芯片：将人重组类固醇受体（androgen receptor）点于醛基化玻片 silyated slides (CEL Associates Inc., USA)，于 N<sub>2</sub> 下低温干燥，使受体与载体片牢固结合。然后以 NaBH<sub>4</sub> 溶液（17mg NaBH<sub>4</sub> 溶于 10ml PBS+1ml 乙醇）清洗 1min，以还原 Schiff 碱形成更稳定的单键结构。将含 1%BSA 的封闭缓冲液滴于芯片上，于保湿盒内 27℃ 振荡温育 0.5h，以 Tris 清洗缓冲液缓慢冲洗 3 次，每次 2min。制备好的芯片可低温保存数周。（具体步骤参见实施实例 1）

2. 检测：将待测样品 20~100μl 滴于蛋白点样区，加入 2 倍体积测试液，内含荧光标记配基 Fluormone™ AL 2nM，室温静置 30min；另一对照区加入相同体积正常血清液和测试剂。同条件处理。反应结束后，以 Tris 清洗缓冲液冲洗 3 次，每次 2min，于 ex=485nm, em=535nm 波长测各点荧光强度，作统计学检验判断是否为阳性，样品最低检出量为 6pg/ml。按实施实例 1 检测方法及公式计算样品中兴奋剂含量。（注：所使用的受体稀释缓冲液、反应结合缓冲液、封闭液、清洗液，及检测观察液参考经典雄激素受体竞争结合试验。）

### 25 实施例 3 麻醉镇痛剂—阿片受体阻断剂检测

麻醉镇痛剂，包括吗啡（morphine）、海洛因（diamorphine）、镇痛新（pentazocine）、哌替啶（pethidine）、美沙酮（methadone）、二氢可待因酮（hydricodone）等，均作用与阿片受体。使用后能使人产生快感及心理亢奋，给运动员造成能超越体能的幻觉，并降低痛感使运动员感觉不到受伤的真实情况，仍继续参加比赛从而造成更为严重的伤害。常用则会成瘾，故还易引起严重的生理及社会问题。

将人类重组阿片受体  $\mu$ -Opioid Receptor (购自 PerkinElmer company) 如实施实例 1 步骤制备蛋白质芯片。如实施实例 1 进行竞争结合试验，反应达到平衡后进行检测。于 ex=493nm, em=516nm 波长检测。最低检测量为 4pg/ml。（注：所使用的受体稀释缓冲液、反应结合缓冲液、封闭液、清洗液，及检测观察液参考经典 opioid 受体竞争结合试验。所使用的荧光配基为 naltrexone fluorescein，购自

Molecular Probes company.)

#### 实施例4 雌激素受体相关兴奋剂检测

与雌激素受体相关的兴奋剂包括两类，一类是蛋白质同化激素，如雄烯二醇  
5 (androstenediol)、雄烯二酮(androstenedione)、甲烯酰龙(formebolone)、  
诺龙(nandrolone)、19-去甲雄烯二酮(19-norandrostenedione)、19-去甲雄  
烯二醇(19-nrandrostenediol)等。

另一类是抗雌激素作用的物质，如氯米芬(clomiphene)、环芬尼  
(cyclofenil)、他莫昔芬(tamoxifen)等。

10 将人类重组雌激素受体 androgen receptor (购自 sigma 公司) 按照实施实  
例 1 制备蛋白质芯片，并检测。于  $\text{ex}=485\text{nm}$   $\text{em}=530\text{nm}$  波长进行检测。最低检出  
限为  $4\text{pg/ml}$ 。(注：所使用的受体稀释缓冲液、反应结合缓冲液、封闭液、清洗液，  
及检测观察液参考经典雌激素受体竞争结合试验。所使用的荧光配基为  
estradiol-FITC, 购自 sigma 公司。)

15

#### 实施例5 离子通道受体相关的利尿剂检测

利尿剂，顾名思义，此类药物有稀释尿液的功能。利尿剂现有 15 种，主要用于  
掩盖或“清洗”体内其它违禁药品的存在，以逃避兴奋剂检查。

将人类重组或经纯化的提取自牛髓样升支粗段(thick ascending limb, TAL)  
20 和远曲小管(distal convoluted tubule, DCT)管腔膜的离子通道受体(如  
thiazide-sensitive  $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$  cotransporter, TSC 和 bumetamide sensitive  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$   
cotransporter, BSC 等)按照实施实例 1 制备蛋白质芯片，并检测。于波  
长  $\text{ex}=378\text{nm}$ ,  $\text{em}=423\text{nm}$  处检测。最低检出限  $5\text{pg/ml}$ 。(注：所使用的受体稀释缓冲  
液、反应结合缓冲液、封闭液、清洗液，及检测观察液参考经典离子通道受体竞  
25 争结合试验。所使用的荧光配基为 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (阿米洛  
利), hydrochloride 购自 molecular probes company.)

#### 实施实例6 人促红细胞生成素 EPO 检测。

将人类重组促红细胞生成素可溶性受体 EPOsR (购自华美公司)，按照实施实  
30 例 1 制备蛋白质芯片，并检测。于  $\text{ex}=532\text{nm}$   $\text{em}=635\text{nm}$  波长进行检测。最低检出  
限为  $4\text{pg/ml}$ 。(注：所使用的受体稀释缓冲液、反应结合缓冲液、封闭液、清洗液，  
及检测观察液参考上述受体竞争结合试验。)

#### 实施例7 多受体集成芯片技术

将上述六种受体分别  $5\mu\text{l}$  加入到 384 孔板内，注意排净气泡。芯片设计对照  
35 点与测定在同一芯片上，在玻璃片基上以单面贴膜划分 2 区，每区  $6\times 5$  点阵列，  
按标准蛋白芯片点距点样。分别加入待测样和标记配基反应液，(综合缓冲液为


- 10mM Tris-HCl+10mM 磷酸缓冲液配制荧光标记配基。)反应完毕后,将经冲洗的芯片送检。具体制备步骤参考蛋白芯片普适方法-实施实例1。以多波长反复扫描(激发波长见实施实例1、2、3、4、5、6)根据荧光强度、各兴奋剂与受体亲和力参数、每点蛋白含量及标记配基浓度计算被测样品含兴奋剂浓度。可根据药物与不同受体的交互作用更加准确的判断兴奋剂种类。(注:所使用的受体稀释缓冲液、反应结合缓冲液、封闭液、清洗液,及检测观察液参考上述受体竞争结合试验,采用混合标记配基。)
- 5

51457-2002

**DELPHION****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**  

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

**The Delphion Integrated View: INPADOC Record**Get Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)Tools: Add to Work File: [Create new Work](#)View: Jump to: [Top](#) Go to: [Derwent](#) [Email](#)Title: **CN1553186A: Analeptic rapid testing biological chip and testing me**Derwent Title: Analeptic rapid testing biological chip and testing method ([Derwent Record](#))Country: **CN China**Kind: **A Unexamined APPLIC. open to Public inspection i**Inventor: **GUANHUA DU; China**  
**ZUHONG LU; China**  
**YONG ZHOU; China**Assignee: **PHARMACEUTICAL INST., CHINESE MEDICINE ACADEMY China**  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)Published / Filed: **2004-12-08 / 2003-06-02**Application Number: **CN2003000137051**IPC Code: Advanced: **C12Q 1/68; G01N 21/64; G01N 33/50; G01N 33/58; G01N 33/68; G01N 33/74;**  
Core: [more...](#)  
IPC-7: **C12Q 1/68; G01N 21/64; G01N 33/50; G01N 33/58; G01N 33/68; G01N 33/74;**ECLA Code: **None**Priority Number: **2003-06-02 CN2003000137051**

Abstract: The present invention provides relative reagent and inspection chip. The inspection method utilizes specificity integration character of excitant receptor protein to excitant molecule to fix relative receptor on surface of solid phase carrier so that excitant composition in test sample can be inspected out for quick screening of tested objects through competition action of excitant molecule and labelled excitant molecule on the receptor.

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>CN1553186A</b>	2004-12-08	2003-06-02	Analeptic rapid testing biological chip and t method
1 family members shown above				

Other Abstract Info: **None**



[Nominate this for the Gallery...](#)



Copyright © 1997-2006 The Tho

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact U](#)